

POROUS REGENERATED CELLULOSE MEMBRANE FOR REMOVING MYCOPLASMA AND REMOVAL OF MYCOPLASMA

3. W1237-01

Patent number: JP3228671
Publication date: 1991-10-09
Inventor: MANABE SEIICHI; others: 01
Applicant: ASAHI CHEM IND CO LTD
Classification:
- international: C12M1/12; B01D61/14; B01D71/10
- european:
Application number: JP19900022132 19900202
Priority number(s):

Abstract of JP3228671

PURPOSE: To obtain the title porous regenerated cellulose membrane having high removal ratio of mycoplasma, having specific average pore diameter range by water filtration speed method, specific membrane thickness and pore structure capable of being approximated by multi-layer structure membrane substantially having multi-stage filtration function.

CONSTITUTION: The above-mentioned porous regenerated cellulose membrane for removing mycoplasma has 30-100nm average pore diameter 2 σ by water filtration speed method and $\leq 20\mu\text{m}$ membrane thickness (d) in a range shown by the formula. The membrane has pore structure capable of being approximated by multi-layer structure membrane substantially having multi-stage filtration function. By using the membrane, mycoplasma can be removed from animal plasma, serum, an aqueous solution of salt or an aqueous solution containing protein or amino acid. In the removal, mycoplasma can be removed in high removal ratio such as $\geq 99.999\%$. In the case of a solution containing protein, permeability of protein is $\geq 80\%$ and recovery ratio can be increased $\geq 90\%$ by filtration followed by washing with a buffer solution, etc., and filtration.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-228671

⑬ Int. Cl.⁹

C 12 M 1/12
B 01 D 61/14
71/10

識別記号

5 0 0

庁内整理番号

8717-4B
8014-4D
8822-4D

⑬ 公開 平成3年(1991)10月9日

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全7頁)

⑭ 発明の名称 マイコプラズマ除去用多孔性再生セルロース膜およびマイコプラズマ除去方法

⑮ 特 願 平2-22132

⑯ 出 願 平2(1990)2月2日

⑰ 発 明 者 真 鍋 征 一 東京都千代田区有楽町1丁目1番2号 旭化成工業株式会社内

⑱ 発 明 者 佐 谷 満 州 夫 東京都千代田区有楽町1丁目1番2号 旭化成工業株式会社内

⑲ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

⑳ 代 理 人 弁理士 渡辺 一雄

明 細 書

1. 発明の名称

マイコプラズマ除去用多孔性再生セルロース膜およびマイコプラズマ除去方法

2. 特許請求の範囲

1. 水透過速度法による平均孔径 $2\overline{r_p}$ が 30nm 以上 100nm 以下で膜厚 d が $20\mu\text{m}$ 以上で下記式の範囲にあり、かつ実質的に多段階透過機能を有する多層構造膜で近似出来る孔構造を有するマイコプラズマ除去用多孔性再生セルロース膜。

$$(1000/7)(2\overline{r_p}) + 10 \leq d \leq (15000/7)$$

$$(2\overline{r_p}) - 14 \quad (\text{ただし単位は } \mu\text{m})$$

2. 特許請求の範囲第1項記載の再生セルロース膜において、見掛け密度法による空孔率

($P_r\rho$) が 15% 以上 60% 以下であり、膜を構成する物質が銅安法再生セルロースであることを特徴とする蛋白質を含有する水溶液よりマイコプラズマを除去する多孔性再生セルロース膜。

3. 電子顕微鏡法による平均孔径 $2\overline{r_p}$ および同法による空孔率 $P_r\rho$ のいずれもが内壁面から外壁面に向って単調に減少しかつ外壁面の近傍ではニューロン様ボイドーキャピラリー様の構造を持つ孔で構成されている中空系の膜であることを特徴とする特許請求の範囲第1および/又は第2項記載のマイコプラズマを除去する、およびウイルスも同時に除去する多孔性再生セルロース膜。

4. 特許請求の範囲第1および/又は、第2および/又は、第3項記載の多孔膜を用い、膜間差圧が1気圧以下で限外透過をすることによって水溶液に混在するマイコプラズマを除去するマイコプラズマ除去方法。

5. 透過対象とする水溶液が動物の血漿もしくは血清、塩の水溶液又は蛋白質もしくはアミノ酸を含有する水溶液であり、透過方法として事実上垂直透過であることを特徴とする特許請求の範囲第4項記載のマイコプラズマ除去方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は塩水溶液又は蛋白質もしくはアミノ酸を含む水溶液中に存在するマイコプラズマを除去する高分子多孔膜および該多孔膜を用いたマイコプラズマの除去方法に関する。ここで多孔膜とは電子顕微鏡を用いて10万倍で観察した場合、明瞭に孔が観察される膜であり、いわゆる透析型人工腎臓用の膜や脱塩用の膜のように分離機能を有する膜の表面には10万倍での電子顕微鏡観察で孔が明瞭には認められない膜は含まれない。換言すれば高分子多孔膜とは水透過速度法による平均孔径が10nm以上の膜ともいえる。

本発明の好ましい適用例として下記のような用途が挙げられる。

- (1) 牛、馬等動物の血漿や血清等の動物由来の体液からのマイコプラズマの除去。
- (2) 細胞培養用の血清含有培地、あるいは無血清培地からのマイコプラズマの除去。
- (3) 遺伝子工学等で使用される蛋白質を含む薬剤

バイオインダストリー分野での研究や生産に大きな影響を与えることがある。マイコプラズマの細胞培養系への混入ルートは、①空気あるいは飛沫、②細胞・組織などの生物材料自体が既感染し、これからの混入、③培地からの混入等多岐にわたる。

マイコプラズマの除去方法あるいは不活化法としては、(イ) 高温・高圧の水蒸気による加熱滅菌法、(ロ) 殺マイコプラズマ化合物（通常抗生物質）を培養系に混入する方法等がある。しかし加熱滅菌法では細胞培養系の主として蛋白質の変性により、蛋白質の生理活性が低下し、細胞が十分に成長しない等の問題点があり、又、加熱滅菌出来ない組成の培地や血清には、加熱滅菌法は適用できない。また化学薬品（殺マイコプラズマ用抗生物質）の添加により不活化させることも一部では成功しているが、必ずしも完全不活化とはいえず、また添加物の細胞への副作用の点において問題を残している。

一方、マイコプラズマの除去の方法として、ろ過による除去が採用されている。しかし、現在市

あるいは水溶液からのマイコプラズマの除去。

(4) ワクチン製造工程中へのマイコプラズマの混入防止。

本発明は、医学、生物化学、畜産分野、生化学工業を含むバイオインダストリー分野等において広く利用できる。

(従来の技術)

マイコプラズマは、人工無細胞培地で発育し得る最小の微生物で、人をはじめ牛、馬、豚、羊、山羊、七面鳥、鶏、鳩、犬、猫、ラット、マウス等のあらゆる動物に感染する。細胞壁がなく、多形態性であり、自己増殖出来る最小の増殖単位は125～250nmで大きいものは600～900nmに達する。細胞培養は、生化学、医学、薬学の研究やバイオインダストリーでの生産において欠かせない操作であるが、この細胞培養においてマイコプラズマが培養細胞系に混入すると、細胞膜の性質が変化し、その結果細胞の形態が変化したり、細胞の代謝系や染色体に異常を来したりすることがある。そのためマイコプラズマの混入は

販されているポリ塩化ビニル・プロピレンコポリマー製の膜（メーカー公称孔径 0.22 μm ）あるいはポリビニリデンジフロライド製の膜（メーカー公称孔径 0.1 μm ）では1回のろ過操作によって細胞培養用培地溶液から完全にマイコプラズマを除去することは不可能である。そのため、2回あるいは3回とろ過を繰り返してマイコプラズマの除去率を高めようとしているのが実情である。さらにこれら市販の膜では、蛋白質水溶液をろ過する場合には、蛋白質の膜への吸着による目詰りが起り、ろ過速度が大幅に減少する。このようなろ過速度の低下のため1～5 kg/cm²の加圧が必要となり、加圧力が高まると蛋白質の膜透過率が大幅に減少する。加圧力によるマイコプラズマ自体の変形が起り、あるいは膜のマイコプラズマ除去率の加圧力の増大に伴う減少も起こっている可能性も大きい。

(発明が解決しようとする課題)

本発明の目的は、マイコプラズマの除去率が高く、動物の血漿もしくは血清、又は蛋白質もしくは

はアミノ酸を含有する水溶液からの蛋白質の回収率が高く、かつ短時間で多量の逕過が出来る蛋白質水溶液からのマイコプラズマの除去用高分子多孔膜およびマイコプラズマ除去方法を提供するにある。

蛋白質水溶液中のマイコプラズマを除去して蛋白質を回収する場合、マイコプラズマ除去の要求達成水準は蛋白質の膜透過の水準にくらべて格段に高い。たとえば、高分子膜を用いて蛋白質と共存するマイコプラズマの除去を行なう場合、蛋白質の膜透過率 $\{=(\text{逕液中の蛋白質濃度}/\text{原液中の蛋白質濃度}) \times 100\}(\%)$ は1~99%の範囲での論議が、あるいは蛋白質の透過率は高めれば高いほど良いとするのが一般的である。一方、マイコプラズマの除去率 $\{=(1 - (\text{逕液中のマイコプラズマ濃度}/\text{原液中のマイコプラズマ濃度})) \times 100\}(\%)$ は、99.99~99.999999%またはそれ以上が問題となる。マイコプラズマの除去のみが目的であれば、膜の平均孔径を小さくすれば、マイコプラズマの除去率は、ある程度向上するで

あろう。しかし、溶液が蛋白質を含有する場合には、平均孔径を小さくすることにより蛋白質による膜の目詰りが起り、蛋白質の透過率が低下するとともに蛋白質を含む溶液の透過速度も低下し、逕過前後における蛋白質の組成変化が大きくなるといった問題が生じる。

(課題を解決するための手段)

本発明の目的を達成するために、本発明においては、水逕過速度法による平均孔径 $2\bar{r}$ が30 nm以上100 nm以下で膜厚 d が20 μm 以上で下記式の範囲にあり、

$$(1000/\bar{r})(2\bar{r}) + 10 \leq d \leq (15000/\bar{r})$$

$$(2\bar{r}) - 14 \quad (\text{ただし単位は } \mu\text{m})$$

かつ実質的に多段逕過機能を有する多層構造膜で近似出来る孔構造を有するマイコプラズマ除去用多孔性再生セルロース膜が提供され、並びに該膜を用いて動物の血漿もしくは血清、塩の水溶液又は蛋白質もしくはアミノ酸を含有する水溶液からマイコプラズマを除去するマイコプラズマ除去方法が提供される。

本発明の第1の特徴は多孔性再生セルロース膜を採用する点にある。再生セルロース膜は水溶液中に存在する蛋白質の吸着がきわめてわずかであり、またわずかに吸着されている蛋白質は可逆的に吸脱着が生じており、吸着に伴う蛋白質の生理活性の変化がほとんど認められない。蛋白質の吸着性において再生セルロースの中でも銅安法再生セルロースにおいて特に有機溶媒(たとえばアセトン)を20重量%以上含有する溶液で凝固して得た構造物において吸着に伴う蛋白質の変性あるいは再生セルロースと蛋白質との相互作用が少ない。したがって銅安法再生セルロースが本目的達成のために特に好ましい。

本発明の第2の特徴は、特定された孔構造を持つ点にある。すなわち実質的に多段逕過機能を有する多層構造膜で近似出来る孔構造を有する。ここで実質的に多段逕過機能を有する多層構造膜とは、次のように説明される。

(a) 高分子多孔膜の表面あるいは裏面(中空糸形状の場合は内壁面あるいは外壁面)に平行な面

内では、セルロース凝集体がネットワーク状の組織を作り、比較的円形状-楕円形状のいわゆる閉じた形(孔として観察出来る形状)を持つ。同一平面内では場所に依存せず、ほぼ同一の孔径分布と孔形状を持ち、この一枚の面の逕過性能の点において、一枚のスクリーンフィルターと近似出来る。

(b) この一枚の面内での孔の相互の配置関係は実質的に無秩序かあるいは多孔膜が中空糸の場合には再生セルロースで構成された粒子の流動に伴う孔の繊維軸方向への配向がわずかに認められる。

(c) この面内ではある特定された孔径分布と平均孔径、面内空孔率が電子顕微鏡写真より測定できる。

(d) 膜表面(中空糸の場合は内壁面)からの膜厚方向での距離を異にする面の相互の間には、平均孔径、孔径分布、面内空孔率のいずれもが実質的には相関性はない。すなわちこれらの孔特性は膜表面からの距離の関数として与えられる。

(e) 膜厚方向から電子顕微鏡で膜断面を観察した場合、膜表面に平行方向（中空系の場合には円周方向）に沿って再生セルローズで構成された粒子が連続化して一部は棒状に変形した形態が観察される。層状構造をもつ多孔膜は、これを液体窒素中で破断し、その断面を電子顕微鏡で観察すると、直径 $0.05 \sim 2 \mu\text{m}$ の粒子（粒子径の平均を $2S_z$ （ μm ）とする）の堆積物で近似される。層状構造の層数は、 $6 \sqrt{d} / 2S_z$ で与えられる。 d は膜厚（中空系の場合の壁厚）（ μm ）である。層数を10以上にするとマイコプラズマの除去率は極端に大きくなる。

上記(a)～(e)の特徴を持つ膜は、実質的に多段濾過機能を有する。

本発明の第3の特徴は特定された平均孔径 $2\overline{r}$ と膜厚 d との組合せを持つ点である。すなわち水濾過速度法による平均孔径（ $2\overline{r}$ ）が 30 nm 以上で 100 nm 以下で膜厚 d （ μm 単位）が $20 \mu\text{m}$ 以上で(1)式の範囲内にある。

$$(1000/7)(2\overline{r}) + 10 \leq d \leq (15000/7)$$

係が経験的に得られる。

蛋白質の透過性をより高く、また濾過速度、濾過容量を大きくするためには素材として銅安法再生セルローズを採用し、かつ見掛け密度法による空孔率（ $P_r\rho$ ）が15%以上60%以下であることが好ましい。 $P_r\rho$ が60%を超えるとマイコプラズマの除去率が急激に低下する。もし濾過対象とする溶液量が極端に少ない場合は、多孔性膜の形状として中空系が、また工業的に多量の濾過が一定条件で行なわれるには中空系が好ましい。

濾過対象とする蛋白質含有の水溶液中にはマイコプラズマのみでなくウイルスが混入する場合も多い。この場合には、両者を除去することが肝要である。両者を濾過によって除去し、かつ蛋白質の濾過率を高く維持するためにはさらに特殊な孔構造を与えることが好ましい。すなわち電子顕微鏡によって観察される膜面に平行な一平面内での平均孔径 $2\overline{r}$ および電子顕微鏡法による面内空孔率 P_{re} のいずれもが内壁面から外壁面に向かって単調的に減少し、かつ外壁面での近傍ではニュー

$$(2\overline{r}) - 14$$

(1)

$2\overline{r}$ が 30 nm 以下の場合、蛋白質の透過性が急速に低下する。特に人血漿あるいは牛血漿のように多種類の成分を持ち、特に中性脂肪等のように水溶液中で微粒子を構成する成分の濃度が高い場合、蛋白質の透過性はより急激に減少する。蛋白質の透過性および濾過速度、濾過容量の点では、 $2\overline{r}$ は大きければ大きいほど良い。しかし $2\overline{r}$ が 100 nm を超えると膜間差圧 0.1 気圧以下での濾過での除去率が99.99%以下となるマイコプラズマ種がある。したがってマイコプラズマの除去率を99.99%以上にするには $2\overline{r}$ は 100 nm 以下でなくてはならない。一方、 $2\overline{r}$ が一定で膜厚 d を変化させた場合 d を大きくするとマイコプラズマの除去率は増大し、また濾過容量も増大する。ただし、濾過速度は減少する。したがって濾過速度を増大させるためには $2\overline{r}$ を増加させる。しかし $2\overline{r}$ の増加はマイコプラズマの除去率を減少させる。そのため実用的に利用可能な濾過条件下で利用出来る d と $2\overline{r}$ との間には(1)式の関

ロン様ボイドーキャピラリ様の構造を持つ孔で構成されている中空系の膜という特徴を付与すればウイルスも除去可能になる。ここでニューロン様ボイドーキャピラリ様の構造とは、直径 $50 \sim 500 \text{ nm}$ の孔（これをボイドと呼称）とこのボイドを中心に多数の直径 $10 \sim 50 \text{ nm}$ の細管状の孔（これをキャピラリと呼称）とで構成された神経細胞に類似した形状を持つ孔構造物を基本単位として構成された孔構造を意味する。この構造の特徴はボイドを連結するにはキャピラリを介してのみ可能である。このような孔の存在は①高分子のモノマーを中空系を用いて濾過後加熱し、重合する、②重合後薄膜に切断し、電顕用試料を作製する、③かくして得られた薄片を銅安液中へ浸漬し中空系の素材の再生セルローズを溶解除去する、得られた電顕用試料を高倍率（5万倍以上）でフィールドエミッション型の走査型電子顕微鏡で観察することによって確認される（この方法で得られる孔の像を孔のネガチブ像と呼称する）。

本発明で示された孔構造、特に好ましい孔構造

の特徴を持つ中空糸は紡糸時に (a) 凝固前にマイクロ相分離を発生させ (b) 該分離で発生した粒子 (高分子濃厚相が粒子となる場合が大部分である) を成長させ、(c) 該分離を膜の表裏面 (中空糸の場合は内壁面、外壁面) に沿って同時に発生させ、この相分離を膜厚方向 (壁厚方向) に進行させる。

(a)~(c) を好適に実行するには厳密に原液および凝固液組成および温度が制御され、かつ中空糸の紡糸の際には糸長方向に張力が働くのを極力おさえる必要がある。

銅安法再生セルロース中空糸を例にして本発明の中空糸の製法を説明する。セルロース濃度3~9%の範囲内であらかじめ設定した溶液を調製する。紡糸原液から未溶解成分および気泡を除去し、さらにより精密に濾過しマイクロ相分離時の核になる成分を極力除去する。紡糸原液は15~30℃の設定された温度に厳密に制御 (通常 $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 以内) されている。環状紡出口の外側紡出口より紡糸原液を吐出させる。環状紡出口の中央紡出口よりには厳密に温度と組成が制御された凝固剤 (中空

剤と略称する) を吐出する。吐出された原液はわずかな距離、気体中を通過後ただちに凝固浴を通過する。この際の凝固浴には中空剤と類似の成分で構成される溶液を採用する。ただし凝固浴の液組成と液温度とは厳密に制御されていることが必要である。中空剤と凝固浴中の液体により、紡糸された原液中でマイクロ相分離が発生する。マイクロ相分離の後、凝固/再生/水洗/乾燥後の最終の中空糸内部の再生セルロース粒子の直径は50~1000nmの範囲内にある。

多層構造を持つ本発明の膜を用いて溶液中に混入したマイコプラズマを効率良く濾過除去するには、濾過の際の膜間差圧を出来るだけ小さくする必要がある。すべてのマイコプラズマを99.99%以上の除去率で除去するには膜間差圧は1気圧以内でなくてはならない。膜間差圧が1気圧を超えると、濾過量がある一定量を越えた時点よりマイコプラズマのわずかな濾出が始まる。また濾過対象が動物の血漿あるいは血清、塩の水溶液あるいは蛋白質あるいはアミノ酸を含有する水溶液の場合、

合、濾過方法として事実上垂直濾過 (デッドエンド濾過方式) が望ましい。垂直濾過により短時間にかつ多量の濾過が可能である。

以下に本発明で測定される種々の物性値の測定方法をまとめて示す。

蛋白質濃度: アルブミンの場合は紫外線吸収スペクトルの波長280nmの透過率を測定し、予め定めた検量線を用いて算出する。濾過前後の溶液中の総蛋白質は、ビュレット試薬による呈色反応を540nmでの吸光度の測定で求める。

アルブミン透過率: 人血清アルブミンを5重量%の濃度で純水中に溶解する。得られた溶液を用いて膜間差圧200mmHgで膜の有効濾過面積1m²あたり、1.0ℓの濾過をした際、濾過前、及び濾液のアルブミン濃度 (それぞれC₀、およびC_f) より次式で透過率を算出する。

$$\text{透過率}(\%) = (C_f / C_0) \times 100 (\%) \quad (2)$$

高分子多孔膜の構造: 再生セルロース多孔膜を樹脂 (たとえば、アクリル樹脂) で包埋後、ウルトラミクロトーム (スウェーデンLKB社製Ultra-

ratome III 8800 型) に装着したダイヤモンドナイフを用いて表面 (中空糸の場合外壁面) から膜厚方向にそって厚さ0.5~1μmの試料を順に切りだす。その試料切片を溶媒 (例えばクロロホルム) で脱包埋後、それぞれの切片の電子顕微鏡写真を撮る。それぞれの切片の写真より注目する一層内での孔半径分布関数N(r)が測定される。ここでN(r)は注目する層の1cmあたり、孔半径がr~r+drに存在する孔の数をN(r)drと表示されるとし

て定義された孔半径頻度分布関数である。平均孔径 \bar{r} および面内空孔率Preはそれぞれ次式で与えられる。

$$\bar{r} = \int_0^\infty r N(r) dr / \int_0^\infty N(r) dr \quad (3)$$

$$\text{Pre}(\% \text{表示}) = \left(\pi \int_0^\infty r^2 N(r) dr \right) \times 100 \quad (4)$$

水濾過速度法による平均孔径(\bar{r} ; nm単位): 純水をあらかじめ平均孔径0.2μmのフィルターを用いて濾過し、微粒子を除去した純水を作る。この純水を20℃で膜間差圧(ΔP)200mmHgの一定圧力に保持して濾過速度J_vを測定する。

ただし、 J_v の単位は (ml/分) である。測定に使用した高分子多孔膜の有効透過面積を A (cm²) とし、見かけ密度法で得られた該多孔膜の空隙率を $Pr\rho$ とすると、 $2\overline{Pr}$ は次式で与えられる。

$$2\overline{Pr} = 2.0 (J_v \cdot d \cdot \eta / \Delta P \cdot A \cdot Pr\rho)^{1/2} \quad (5)$$

ここで、 d は膜厚 (μ m 単位)、 η は純水の粘度 (センチポイズ単位)、 $Pr\rho$ は水膨潤時の見かけ密度 ρ_{sw} 、セルロースの密度 $\rho_s = 1.561$ g/ml を用いて、次式で算出される。

$$Pr\rho(\%) = (1 - \rho_{sw} / \rho_s) \times 100 \quad (6)$$

マイコプラズマの定量法：寒天培地上のコロニー形成能を指標とする CFU 法で測定した。

(実施例)

実施例 1

セルロースリンターを精製しこれを公知の方法で調製した銅アンモニア溶液 (銅/アンモニア/水の重量比が 3.7/6.3/90.1) 中に 4.9 重量%で溶解し 2 回透過後脱泡し紡糸原液とした。この紡糸原液を $25.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ に制御しつつ紡口直前に多重メッシュフィルターを設置し、環状紡出口

の外側紡出口 (外径 2.5 mm ϕ 、内径 1.5 mm ϕ) より 2.3 ml/分で吐出させた。一方水/アセトン/アンモニアの重量比 100.0/51.4/0.91 で厳密に組成が制御された溶液 (中空剤) を採用し、これを $25.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ に温度制御しつつ中央紡出口 (外径 0.4 mm ϕ) より 4.2 ml/分で吐出させた。吐出された糸状物を約 5 mm の距離を空中走行後、水/アセトン/アンモニア (重量比 100.0/60.0/1.0) の組成で厳密に制御された $25.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ の混合溶液中に導き該溶液中で 5.0 m/分の速度で巻き取った。この際糸長方向への張力が働かないように凝固浴の形状および凝固浴中の凝固液の流れ等が制御されている。吐出直後の透明青色状の繊維状物は次第にミクロ相分離を生起し、引き続いて凝固が起こり、繊維としての構造が形成された。その後、 $25.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$ で 2 重量%の硫酸水溶液で収縮率 5% で設定された定長下で再生し、その後水洗した。得られた中空糸中の水をメタノールで置換後、 20.0°C で真空乾燥した。かくして得られた中空糸の外径は 380 μ m、膜厚 (壁厚)

は 42 μ m、内径は 295 μ m であった。該中空糸の内外壁面の走査型電子顕微鏡観察によれば、両壁面はいずれもネットワーク構造をとり、また該ネットワークが堆積した構造を示す。また該中空糸のネガティブ像では外壁面の近傍ではニューロン様ボイドーキャビラリ様の構造を持つ孔で構成されている。 $2\overline{Pr}$ および Pre は内壁面から外壁面に向かって単調に減少している。ただし、最内外層のみは $2\overline{Pr}$ と Pre は特に大きい値となる。粒子直径 $2S_z$ は 0.14 μ m、 $2\overline{Pr}$ は 72 nm、 Pre は 43% であった。アルブミンの透過率は、99.5% 以上であった。この中空糸を 250 本束ねて有効透過面積 0.02 m² の円筒状の透過用モジュールを組み立て、マイコプラズマ除去用フィルターモジュールとした。マイコプラズマ *Mycoplasma orale* を 5.1×10^5 CFU/ml の濃度で含有する液をリン酸緩衝食塩水で 2 倍に希釈して透過に供する原液を調製した。サンプル液 500 ml を 200 mm Hg の加圧下で垂直透過した。透過は 1 回のみとした。なお 800 mm Hg の加圧下での垂直透過および

200 ml/分の流速で循環させながらの透過も実施した。なおポリビニリデンジフロライド製公称孔径 0.1 μ m の膜を用いて 200 mm Hg の圧力で垂直透過を比較例として実施した。透過液をそれぞれの所定の透過量において 50 μ l とり、検定用シャーレに接種し、コロニー形成法によってマイコプラズマを定量した。結果を第 1 表にまとめて示す。

第 1 表

項 目	透過膜	下記透過量の際の透過液中のマイコプラズマ濃度 CFU/ml				
		20 ml	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml
実施例 * 1	CAM **	0	0	0	0	0
実施例 * 2	CAM **	0	0	0	1.0	2.0
実施例 * 3	CAM **	0	0	0	0	0
実施例 * 4	PVDF **	300	530	820	2000	20000

- * 1 垂直透過 200 mmHg (透過圧)
- * 2 垂直透過 800 mmHg
- * 3 垂直透過 200 mmHg
- * 4 垂直透過 200 mmHg
- * 5 銅安法再生セルロース
- * 6 ポリビニリデンジフロライド

実施例 2

細胞培養用標準培地 (MEM) 溶液に、胎児牛血清を重量ベースで 10% 加え、この混合液に①マイコプラズマ *Acholeplasma laidlawii* を 2.4×10^7 CFU/ml の濃度になるように添加し、あるいは②エイズ原因ウイルス HIV を 5.5×10^5 PFU (ブランクフォーミングユニット) / ml になるように添加した。これらの溶液 80 ml を、実施例 1 と同様の多孔膜および透過条件下で透過した。透過液中のマイコプラズマ濃度および蛋白質の回収率をまとめると第 2 表が得られた。

(以下余白)

項 目	透過膜	透過液中の濃度		総蛋白質透過率 (%)
		マイコプラズマ (CFU/ml)	HIV (PFU/ml)	
実施例 * 1	CAM **	0	0	98
実施例 * 2	CAM **	0	0	95
実施例 * 3	CAM **	0	0	90
実施例 * 4	PVDF **	3.2×10^4	2.6×10^5	64

- * 1 垂直透過 200 mmHg (透過圧)
- * 2 垂直透過 800 mmHg
- * 3 垂直透過 200 mmHg
- * 4 垂直透過 200 mmHg
- * 5 銅安法再生セルロース
- * 6 ポリビニリデンジフロライド

(効 果)

本発明により動物の血漿、血清あるいは細胞培養用培地溶液、その他溶液に混入したマイコプラズマを高い除去率たとえば 99.999% 以上で除去出来るとともに溶液が蛋白質を含有している場合には、蛋白質の透過率が 80% 以上でかつ回収率が透過後緩衝溶液等で洗浄透過することにより、90% 以上が可能となる。また透過速度が大きく、透過速度の経時的な減少が少ないために、経時的な変質の恐れがある蛋白質等からのマイコプラズマの除去に適している。さらにウイルスの混入の恐れがある場合にもマイコプラズマのみでなくウイルスも同時に除去が可能になる。

特許出願人 旭化成工業株式会社

代 理 人 渡 辺 一 雄